

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **06181739 A**

(43) Date of publication of application: **05.07.94**

(51) Int. Cl. **C12M 1/02**
C12M 1/00
// C12N 11/04

(21) Application number: **03093453**

(22) Date of filing: **29.03.91**

(71) Applicant: **AGENCY OF IND
SCIENCE & TECHNOL**

(72) Inventor: **KOSUGI YOSHIJI
SHIRAKI MASARU**

**(54) BINARY PHASE IMMOBILIZED ENZYME
REACTOR**

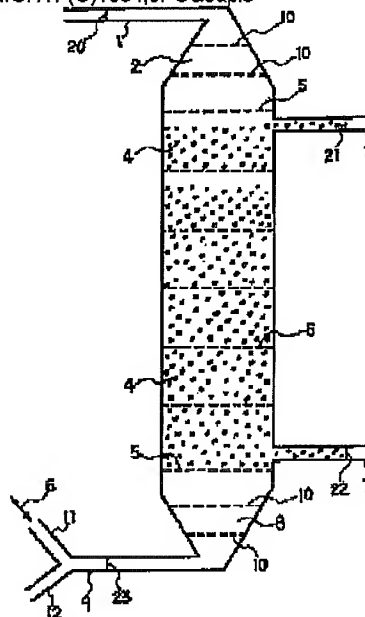
(57) Abstract:

PURPOSE: To provide a binary phase bioreactor for efficiently performing a reaction using an immobilized enzyme.

CONSTITUTION: The objective binary phase immobilized enzyme reactor is provided with stationary tanks 2, 8 at the top and the bottom and two or more stirring tanks 4 at the intermediate part. These tanks are separated from each other with liquid-permeable partition plates 5 having micropores inhibiting the passage of the immobilized enzyme. The stirring tanks contain immobilized enzyme. A pipe 1 for discharging a product having low specific gravity is attached to the top end of the top stationary tank, the top stirring tank is furnished with a pipe 3 for supplying a substrate having high specific gravity, the bottom stirring tank is furnished with a pipe 7 for supplying a substrate having low specific gravity and a pipe 9 for discharging a product having high specific gravity is attached to the lower end of the bottom stationary tank. A pulse generator 6 is connected to the bottom of the bottom

stationary tank.

COPYRIGHT: (C)1994,JPO&Japio



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-181739

(43) 公開日 平成6年(1994)7月5日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	片内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 M 1/02	A			
1/00	Z			
// C 1 2 N 11/04				

審査請求 有 請求項の数 1 (全 4 頁)

(21) 出願番号 特願平3-93453

(22) 出願日 平成3年(1991)3月29日

(71) 出願人 000001144

工業技術院長

東京都千代田区霞が関1丁目3番1号

(72) 発明者 小杉 佳次

茨城県つくば市東1丁目1番3号 工業技術院微生物工業技術研究所

(72) 発明者 白木 勝

茨城県つくば市東1丁目1番3号 工業技術院微生物工業技術研究所

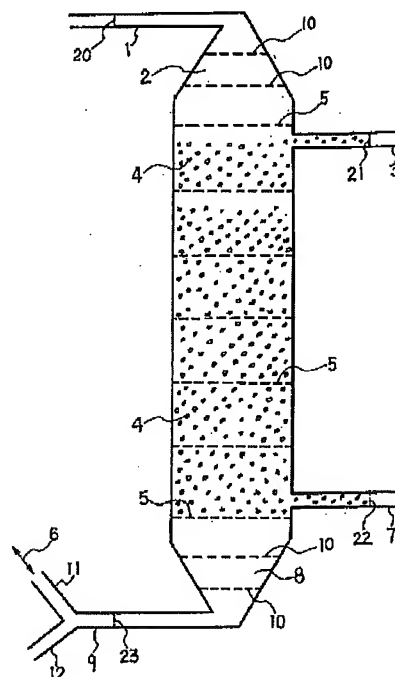
(74) 復代理人 弁理士 池浦 敏明 (外1名)

(54) 【発明の名称】 二相系固定化酵素リアクター

(57) 【要約】

【目的】 固定化酵素を用いる反応を効率的に実施するための二相系バイオリアクターの開発。

【構成】 上端及び下端に静置槽2、8を有し、中間部に2個以上の攪拌槽4を有するとともに、それら各槽を固定化酵素を通過させない微小透孔を有する通液性の仕切り板5で仕切り、かつ該攪拌槽には固定化酵素を収容させ、さらに該上端の静置槽の上端部には低比重生産物排出管1、該上端の攪拌槽には高比重基質供給管3、該下端の攪拌槽には低比重基質供給管7、該下端の静置槽の下端部には高比重生産物排出管9を配設し、下端の静置槽の下部にパルス発生機6を連結させたことを特徴とする二相系固定化酵素リアクター。



1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 上端及び下端に静置槽を有し、中間部に2個以上の攪拌槽を有するとともに、それら各槽を固定化酵素を通過させない微小透孔を有する通液性の仕切り板で仕切り、かつ該攪拌槽には固定化酵素を収容させ、さらに該上端の静置槽の上端部には低比重生産物排出管、該上端の攪拌槽には高比重基質供給管、該下端の攪拌槽には低比重基質供給管、該下端の静置槽の下端部には高比重生産物排出管を配設し、下端の静置槽の下部にパルス発生機を連結させたことを特徴とする二相系固定化酵素リアクター。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、固定化酵素を用いて二相を形成する反応物質を反応させるためのバイオリアクターに関するものであり、油化学工業、医薬品工業、食品工業等に広く応用されるものである。

【0002】

【従来の技術】固定化酵素を用いた二相系バイオリアクターとして、本発明者らが先に開発した上端及び下端に静置槽を有し、中間部に1個以上の攪拌槽を有するとともに、それら各槽を固定化酵素を通過させない微小透孔を有する通液性の仕切り板で仕切り、且つ該攪拌槽には固定化酵素を収容させ、さらに該上端の静置槽にはその下部に高比重基質供給管及びその上部に低比重生産物排出管を配設し、該下端の静置槽にはその下部に高比重生産物排出管及びその上部に低比重基質供給管を配設したことを特徴とする二相系バイオリアクターを用いて低比重基質供給管にパルス発生機を連結させパルス攪拌させながら反応させることを開示した（小杉、白木、国枝、村瀬、特願平2-49797号）。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、前発明の二相系バイオリアクターにおいては、上端及び下端の静置槽中へ基質を供給しているため、静置槽と攪拌槽を仕切る仕切り板により基質が生産物中に跳ね返され、基質が生産物中に巻き込まれることと、低比重基質供給管より高比重生産物排出管の間の油水分離が悪いという問題が残っていたが、本発明はこれらの問題を解決した二相系固定化酵素リアクターを提供することである。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明は、従来法の諸欠点を改良すべく鋭意研究を重ねた結果、本発明を完成したものである。即ち本発明によれば、上端及び下端に静置槽を有し、中間部に2個以上の攪拌槽を有するとともに、それら各槽を固定化酵素を通過させない微小透孔を有する通液性の仕切り板で仕切り、かつ該攪拌槽には固定化酵素を収容させ、さらに該上端の静置槽の上端部には低比重生産物排出管、該上端の攪拌槽には高比重基質供給管、該下端の攪拌槽には低比重基質供給管、該下端

2

の静置槽の下端部には高比重生産物排出管を配設し、下端の静置槽の下部にパルス発生機を連結させたことを特徴とする二相系バイオリアクターが提供される。

【0005】以下、本発明の好ましい二相系固定化酵素リアクターの1つの実施例について、図1により説明する。図中、1は低比重生産物排出管、2は上端の静置槽、3は高比重基質供給管、4は攪拌槽、5は仕切り板、6はパルス発生機、7は低比重基質供給管、8は下端の静置槽、9は高比重生産物排出管、10はエマルジョン破壊装置、11はパルス発生機につながれた分岐管、12は定量ポンプにつながれた分岐管を示す。20, 21, 23は多孔質板又は金網であり、必要に応じて付設される。上端の静置槽2と下端の静置槽8は望ましくは円錐状のものが用いられる。その理由は微細なエマルジョンが発生しても、低比重生産物排出管1、あるいは高比重生産物排出管9に達するまでに器壁にあたってエマルジョン粒子の破壊が起こり、二相分離をしやすくするためである。エマルジョン破壊装置10を設けると、二相分離が良くなるとともに、生産物中に基質が巻き込まれることを防止できる。エマルジョン破壊装置は、従来良く知られている構造のものをを用いることができ、例えば、単にステンレススチールふるい板などでも良いが、望ましくは、それら静置槽にガラスビーズ等を充填して、エマルジョンを破壊し二相分離する過程をできるだけ長くする。上端の静置槽の上部には低比重生産物排出管1、下端の静置槽の下部には高比重生産物排出管9が設けられている。静置槽の温度は外套管等により一定の温度に設定できるようになっていることが望ましい。

【0006】該二相系固定化酵素リアクターの中間部に設ける2個以上の攪拌槽は、固定化酵素を存在させた反応槽である。この攪拌はパルス流によって行われ、角度付きパドル羽根等を特に付設しなくても油水分離は完全に達成できる。上端の攪拌層には、高比重基質供給管3、下端の攪拌層には、低比重基質供給管7が設けられる。これらの攪拌槽も所定の温度に設定できるようにする。また静置槽2, 8と攪拌槽4、高比重基質供給管3と攪拌槽4、低比重基質供給管7と攪拌槽4、あるいは攪拌槽4の間をそれぞれ仕切る仕切り板5は通液性のもので、固定化酵素が通過できにくい網目構造を持つステンレススチールのふるい板等の多孔板を用いることが望ましい。エマルジョン粒子の破壊を完全にするために、ふるい板を重層したり、ガラスビーズなどを重層したふるい板を用いても良い。本発明の二相系固定化酵素リアクターに用いる反応液の攪拌には、パルス発生機が用いられる。パルス発生機は脈流送液ポンプをそのまま用いても良いし、送液ポンプの他にリアクター内の仕切り板に垂直の往復運動を反復させるポンプを別に取り付けてもよい。パルス発生機はリアクターの最下端部に取り付けるのが良い。通常は下端の静置槽の下部に位置する高

比重生産物排出管に付設される。パルス攪拌はポンプにより短時間には往復運動させるだけなので、簡単に行える。周期及び振幅はいずれの値も取りうるがあまりゆるやかであると固定化酵素表面の反応物質の移動速度が遅くなるため、外部拡散抵抗が生じたり、油水分離が悪くなったりする。

【0007】二相系固定化酵素リアクターにおける低比重基質は、固定化酵素反応の基質となるもので、高度不飽和脂肪酸含有油脂、例えば、鰯油、肝油、きり油等；ヒドロキシ酸含有油脂、例えば、ひまし油等；石鹸原料等として注目されている廃油や、その他各種のエステル、グリセライド等であることができ、通常水に溶けにくい物質で、その比重は水の比重より軽い。ヘキサン等の非極性溶媒を添加した場合は、それも低比重基質として扱われる。また高比重基質としては、水、グリセリン等の水溶性物質またはその水溶液が用いられる。二相系固定化酵素リアクターに使用される酵素は、加水分解、アシル結合の合成、あるいは交換機能を持つリパーゼ等を固定化した酵素であることができる。油脂の加水分解には、シュウドモナス属のリパーゼを陰イオン交換樹脂に固定化した固定化リパーゼを用いると、反応物質が流動性を持つ50～60℃においても長期間安定であり、前記に示した各種の油脂の分解性も良く、 ω -3高度不飽和脂肪酸を濃縮するための選択分解も行うので、望ましい酵素である。二相系固定化酵素リアクターの運転例としては、実施例1に示すごとく低比重基質供給管7より ω -3高度不飽和脂肪酸含有油脂を送液ポンプにて供給し、高比重基質供給管3より水を送液ポンプにて供給し、高比重生産物排出管9より送液ポンプにてグリセリンを含んだ水を水の供給量にほぼ等しい量回収すると、低比重生産物排出管1より供給油脂量とほぼ等しい量の脂肪酸及びグリセリドがパルス流を伴いながら回収される。本発明に使用されるリアクター内に存在する酸素は、窒素、アルゴン等の不活性ガスで置換し、反応は大気中の酸素に反応物質が触れない条件にて実施される。酸素に触れると過酸化物質が急激に上昇するので注意を要する。アルゴンは高価であるが、比重が重いので置換処理には便利な気体である。本発明に使用される反応温度は二重結合の移動等を防ぐためには低い方がよいが、酵素反応の効率性から30～60℃が選ばれる。望ましくは、40～60℃である。

【0008】本発明の二相系固定化酵素リアクターにおいては、反応基質を攪拌槽に供給するので、生産物中に基質が巻き込まれることが改善され、しかも浮遊状態にある固定化酵素を含む反応槽にリアクター最下部9よりパルス流を送り、唯一解放状態の低比重生産物排出管1よりパルス流を伴って低比重生産物を得ることができる

ので、リアクター全体にパルス流攪拌を行き渡らせることができる。この二相系固定化リパーゼリアクターにより高度不飽和脂肪酸含有油脂を連続分解することにより、油状生産物と水溶性生産物とを連続分別採取することができる。

【0009】

【実施例】次に本発明を実施例によりさらに詳細に説明する。

【0010】実施例1

図1に示すような反応器を用意した。この場合、仕切り板5及びエマルジョン破壊装置10は75ミクロンの編目を持つステンレススチールの仕切り板である。図面には示していないが反応槽は外套管により囲まれていて温度が一定に保たれるようになっている。上端と下端に円錐状の静置槽2、8を設け、上端の静置槽2の上端部に低比重生産物排出管1がある。中間の6個の攪拌槽のうち上端の攪拌槽には高比重基質供給管3があり、下端の攪拌槽には低比重基質供給管7がある。各槽の直径は50mm、高さは26～30mmで、上下の静置槽まで含めた反応器内の体積は421mlであった。6個の攪拌槽に加えた固定化酵素量は、合計で64.4gであった。固定化酵素は洛東化成社が生産しているエンチロンPFである。この酵素はシュウドモナス フルオレセンス パイオタイプIにより生産されたリパーゼを陰イオン交換樹脂に固定化したものである。高比重生産物排出管9には120度の方向に三方に分かれた分岐管を有する継ぎ手とその分岐管の1つを介してつないであり、残りの一方の分岐管11はパルス発生機6につながれ、残りの他方の分岐管12には送液ポンプが接続されている。パルス発生機6は1分間に15回ずつ脈流が流れるようになっている。1回の脈流の大きさは約15mlである。高比重生産物排出管9を閉じて高比重基質供給管より水、低比重基質供給管より鰯油を両者が約1:1になるようにリアクター内に基質を満たし、送液ポンプは止めたままパルス発生機のみを一晩動かすと二相分離が達成される。なお基質は窒素ガスで飽和にしたのち窒素ガス加圧下の容器に保存する。パルス発生機を作動しながら低比重基質供給管7より鰯油を5ml/時間、高比重基質供給管3より水を2.5ml/時間で供給し、高比重生産物排出管9より120～190mg/mlのグリセリンを含む高比重生産物を1～3ml/時間で回収してやると、低比重生産物が3～5ml/時間で回収された。低比重生産物は窒素で容器中の大気を置換した18℃の容器に保存した。各運転時間の低比重生産物の加水分解率及び過酸化物質を表1に示す。

【0011】

【表1】

5

6

運転時間 (時間)	24	48	72	96	120	144	160	182	264	311	335	359
加水分解率 (%)	14	44	68	75	82	79	80	81	83	84	78	81
過酸化値 (meq/kg)	10		12	15		24	23		10		8	18

【0012】表1から本発明の二相系固定化酵素リアクターを用いることにより、鰯油を81%で加水分解し、過酸化値が10～20の分解産物が連続的に得ることができる。

【0013】

【発明の効果】本発明によれば、固定化酵素を用いる反応を効率的に実施することができる。本発明で用いる二相系反応は、油脂分解等油化学工業に広く実施されている反応である。しかも常温常圧で反応でき、高度不飽和脂肪酸及びグリセリンの変性も少なく、人と環境にとって望ましいプロセスとして大いに利用されるものである。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の二相系固定化酵素リアクターの説明断

面図である。

【符号の説明】

- 1 低比重生産物排出管
- 2 上端の静置槽
- 3 高比重基質供給管
- 4 攪拌槽
- 5 仕切り板
- 6 パルス発生機
- 7 低比重基質供給管
- 8 下端の静置槽
- 9 高比重生産物排出管
- 10 エマルジョン破壊装置
- 11 パルス発生機につながれた分岐管
- 12 定量ポンプにつながれた分岐管

【図1】

